

03 FEV. 2005



REC'D 11 FEB 2005	
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

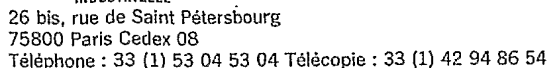
Martine PLANCHE

DOCUMENT DE  
PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1. a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**cerfa**  
N° 11354\*02

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 1/2



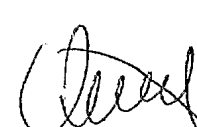
DB 540 W / 010801

<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Réservé à l'INPI</div> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <b>REMISE DES PIÈCES</b>  DATE  LIEU <b>5 DEC 2003</b>  <b>75 INPI PARIS 34 SP</b>  N° D'ENREGISTREMENT  NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0314299</b>  DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>05 DEC. 2003</b>  PAR L'INPI </div>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b>  <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> </div> <div style="margin-top: 20px;"> <b>CABINET BEAU DE LOMENTIE</b>  <b>158, rue de l'Université</b>  <b>75340 PARIS CEDEX 07</b> </div>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> <i>(facultatif)</i> <b>3H263520/2/MN</b>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie </div>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b> </div> <div style="margin-top: 5px;"> Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> </div> <div style="margin-top: 5px;"> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> </div> <div style="margin-top: 5px;"> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> </div> <div style="margin-top: 5px;"> <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____ </div> <div style="margin-top: 5px;"> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date _____ </div> <div style="margin-top: 5px;"> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____ </div>		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b> </div>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> </div> <div style="margin-top: 20px; text-align: center;"> Procédé de purification du corail </div>			
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b>  <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b>  <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b>  <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b> </div>		<div style="margin-top: 5px;"> Pays ou organisation _____ N° _____  Date _____ </div> <div style="margin-top: 5px;"> Pays ou organisation _____ N° _____  Date _____ </div> <div style="margin-top: 5px;"> Pays ou organisation _____ N° _____  Date _____ </div> <div style="margin-top: 5px;"> <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b> </div>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b> </div>		<div style="margin-top: 5px;"> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b> </div>	
<div style="margin-top: 5px;"> Nom ou dénomination sociale  Prénoms  Forme juridique  N° SIREN  Code APE-NAF </div>		<div style="margin-top: 5px;"> <b>BIOCORAL, INC</b>    <b>Société de l'Etat du Delaware</b>        </div>	
<div style="margin-top: 5px;"> Domicile ou siège  Rue  Code postal et ville  Pays </div>		<div style="margin-top: 5px;"> <b>9 East Loockerman Street</b>  <b>_____ Dover - Delaware 19001</b>  <b>ETATS-UNIS D'AMERIQUE</b> </div>	
<div style="margin-top: 5px;"> Nationalité  N° de téléphone <i>(facultatif)</i>  Adresse électronique <i>(facultatif)</i> </div>		<div style="margin-top: 5px;"> <b>Américaine</b>    N° de télécopie <i>(facultatif)</i> </div>	
<input type="checkbox"/> <b>S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 2/2

**BR2**

REMISE DES PIÈCES DATE <b>5 DEC 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0314299</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI 3H263520/2/MN DB 540 W / 210502
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		<b>CABINET BEAU DE LOMENIE</b>
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	158, rue de l'Université
	Code postal et ville	75 013 PARIS CEDEX 07
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01. 44. 18. 89. 00
N° de télécopie (facultatif)		01. 44. 18. 04. 23
Adresse électronique (facultatif)		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG		
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b> NEVANT Marc CPI n° 98.0509		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 

La présente invention concerne un procédé de purification du corail, ainsi que le corail obtenu par ce procédé.

L'invention trouve notamment application dans le domaine médical.

Le corail, qui présente une structure poreuse, est composé majoritairement  
5 de carbonate de calcium, sous forme aragonite, le reste étant constitué d'oxydes de magnésium et de fer ainsi que de substances organiques responsables de sa couleur. Sa dureté varie de 2,5 à 3,5 sur l'échelle de Mohs.

Il existe à ce jour plusieurs substituts osseux à base de corail autorisés par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). Un de  
10 ces produits, commercialisé par la Société INOTEB sous la dénomination BIOCORAL®, est obtenu par traitement du corail à la surface de ses pores, ce qui permet d'éliminer une partie des substances organiques mentionnées ci-dessus.

Une analyse morphologique plus poussée du corail (microscopie électronique à balayage et thermique couplée à la spectroscopie de masse)  
15 montre toutefois que lesdites substances organiques sont présentes non seulement dans les pores du corail, mais également aux joints de grains des particules de carbonate de calcium. Le traitement mis en place pour le produit BIOCORAL®, ne permet pas d'extraire les substances organiques localisées aux joints de grains, qui représentent environ 90 % de la totalité des substances  
20 organiques.

Un problème que vise à résoudre la présente invention est donc de disposer de corail qui puisse être utilisé pour fabriquer des substituts osseux de qualité comparable à celle des implants synthétiques existants.

Un autre problème que vise à résoudre l'invention est de disposer d'un  
25 procédé qui permette d'éliminer les substances organiques présentes dans le corail sans modifier la structure cristalline de ce dernier.

Il a maintenant été découvert, et c'est le fondement de l'invention, que le traitement du corail par un fluide en conditions supercritiques permet d'apporter une solution aux problèmes énoncés ci-dessus.

30 Ainsi, selon un premier aspect, l'invention a pour objet un procédé d'extraction de substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide à une température inférieure à 270° C, de

préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C.

Selon le procédé de l'invention, on utilise donc un fluide particulier dans des conditions dites "supercritiques", c'est-à-dire que le fluide possède les propriétés invasives d'un gaz tout en se comportant comme un liquide. De ce fait, le fluide est capable de diffuser dans la structure poreuse du corail sans aucun problème de mouillabilité, ce qui permet d'optimiser l'extraction des substances organiques (que l'on désignera également par la suite par "matrice organique") présentes dans le corail.

Le fluide susceptible d'être utilisé dans le procédé de l'invention doit avoir une température critique inférieure à 270° C, de préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C. A titre d'exemple, on peut citer l'éthanol, l'acétone, le dioxyde de carbone, ou un mélange de fluides qui possède une température critique inférieure aux valeurs mentionnées ci-dessus. On peut ainsi envisager d'utiliser un mélange d'éthanol et d'eau dans des proportions telles que la température critique du mélange remplit bien les conditions énoncées ci-dessus. Avantageusement, on utilise de l'éthanol du fait de la disponibilité de ce produit et de son caractère peu onéreux et non-toxique.

Le procédé de l'invention est mis en œuvre à une pression supérieure à la pression critique du fluide ou du mélange de fluides utilisé. De ce point de vue, la pression critique des fluides mentionnés ci-dessus, est facilement accessible. Généralement, on met en œuvre le procédé à une pression comprise entre environ 100 MPa et 300 MPa, de préférence entre environ 120 MPa et 250 MPa.

La durée du traitement n'est pas critique en soi et varie généralement entre quelques minutes et quelques heures, en fonction du fluide utilisé. Il est par exemple possible de traiter le corail pendant une durée comprise entre environ 15 min. et 1 h.

Selon un second aspect, l'invention concerne le corail substantiellement exempt de substances organiques, tel qu'obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

Par "corail substantiellement exempt de substances organiques", on entend du corail contenant au moins deux fois moins de substances organiques que le corail non traité.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne les substituts osseux réalisés à partir de corail substantiellement exempt de substances organiques. Ces substituts osseux peuvent être obtenus par des méthodes bien connues de l'homme du métier.

5 L'invention va maintenant être illustrée à l'aide des exemples ci-après.

**Exemple 1 : Traitement supercritique du corail**

Le corail brut (Porites Lutéa ; forme aragonite) est traité dans un dispositif de génération de haute pression d'eau dans une enceinte ayant un volume fixé. Celle-ci, réalisée dans un alliage à hautes caractéristiques  
10 mécaniques, a une profondeur de 229 mm, un diamètre interne de 55 mm. Elle est fermée par un obturateur en forme de champignon supportant le joint métallique qui assure l'étanchéité par sa déformation. L'étanchéité au démarrage (sans pression dans l'autoclave) est réalisée par la remontée de l'obturateur, à l'aide de 8 vis dans la partie supérieure. La pression appliquée dans l'enceinte par  
15 la pompe ou la température va comprimer le joint qui va de lui-même rendre étanche le système.

La température est mesurée à l'intérieur de l'enceinte par un thermocouple monté dans la partie haute du réacteur. Il est en contact direct avec le fluide sous pression.

20 Le corail est placé dans des flacons souples de 20 ml en Téflon PFA (Réf. M77400, Fisher Bioblock Scientific) résistant à des températures avoisinant les 300 °C et supportant la déformation due à la pression. La pression s'exerçant sur les parois internes et externes du flacon est la même. En effet, le flacon ne contenant pas ou très peu d'air, le liquide présent à l'intérieur du flacon et le  
25 liquide transmetteur (eau) sont à la même pression, la paroi est donc comme « invisible » et ne subit qu'une légère déformation due à la compressibilité de l'eau. Le traitement s'effectue en présence d'éthanol comme fluide "supercritique", à une température de 230° C sous une pression de 100 à 300 MPa, pendant 1 h.

30 **Exemple 2 : Détermination de la quantité de substances organiques résiduelles dans le corail traité**

L'échantillon obtenu à l'exemple 1 est broyé au mortier et pesé (masse MB - matière brute - d'environ 3 g). On prélève 3 g de la poudre obtenue que

l'on dissous dans 135 ml d'HCl 0,1 N, sous agitation pendant 1 h. La solution ainsi obtenue est dialysée sur une membrane de poids moléculaire 12 000 à 16 000 (référence MCWO), puis congelée à  $-80^{\circ}\text{C}$  et lyophilisée. Le lyophilisat est à son tour pesé (masse MO – matière organique – d'environ 3 g).

5 A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

La figure 1 représente le rapport MO/MB pour chacun des trois échantillons. On peut constater que le traitement "supercritique" selon l'invention permet d'obtenir du corail contenant environ deux fois moins de substances  
10 organiques que le produit BIOCORAL®.

**Exemple 3 : Détermination de la quantité de protéines résiduelles dans le corail traité**

*1/ Préparation de la solution de travail et des échantillons :*

- On mélange 50 volumes de la solution A avec 1 volume de la solution  
15 B. La solution de travail est légèrement trouble au début, puis rapidement elle s'éclaircit avec agitation douce au vortex. Sa couleur est vert opalescent.
- On broye les échantillons au mortier et on pèse la poudre obtenue.
- On dissout 1 g de poudre dans 45 ml d'HCL à 0,6 N pendant 1 heure  
20 sous agitation.

*2/ Procédure pour la détermination :*

- On dose la fraction soluble dans l'eau : 1,2 mg de matière organique sont solubilisés dans 75  $\mu\text{L}$  d'eau.
- On solubilise le culot restant après centrifugation dans 75  $\mu\text{L}$  de NaOH  
25 à 0,3 N.
- On prélève 25  $\mu\text{L}$  de chaque standard (0  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  et 250  $\mu\text{g/ml}$ ) de chaque échantillon (préparés de la même manière que les échantillons à doser) et on les distribue dans les puits d'une plaque de 96 puits.
- 30 - On couvre la plaque et on incube pendant 30 min. à  $37^{\circ}\text{C}$ .
- On lit la densité optique à 562 nm une fois que la plaque est refroidie à température ambiante.



A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

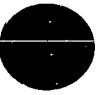
La figure 2 représente le rapport protéines/MB pour chacun des trois échantillons. On peut constater que le traitement "supercritique" selon l'invention permet d'obtenir du corail duquel environ deux fois plus de protéines ont été  
5 extraites, comparé au produit BIOCORAL®.

**Exemple 4 : Mise en évidence de la prolifération cellulaire de cellules osseuses sur le corail traité**

On découpe des cylindres ( $\varnothing=12$  mm) en disque d'un mm d'épaisseur à l'aide d'une scie diamantée, puis on les stérilise par chaleur sèche à 100°C  
10 pendant 1h30 (3 cycles). Les disques sont déposés sur un lit d'aragose 0,1 % dans des boîtes de culture (NUNC ; 24 puits, 2 cm<sup>2</sup>). La suspension cellulaire est déposée sur chaque disque à raison de 20 000 cellules MG63/cm<sup>2</sup> (1,13 cm<sup>2</sup> x 2 car porosité – 22 600 cellules soit environ 50 000 cellules par échantillon), dans  
15 un volume de 100 µL de milieu de culture complet (IMDM : Iscove's Modified Dubelcco's Medium, 10 % SVF – sérum de veau foetal). Après 30 minutes pour laisser les cellules adhérer, on complète avec 1 ml de milieu. Le milieu est changé tous les deux jours.

On enlève le milieu de culture complet et on rince avec du milieu seul. On  
20 prive les cellules pendant 17 heures (milieu seul + 10 % de SVF, thymidine tritiée, 10 µCi/ml (Réf : TRK 758 AMERSHAM), soit 10 µL de <sup>3</sup>HT/Volume de milieu complet). On élimine le surnageant (à conserver pour élimination ultérieure), puis on enlève le matériau de l'agarose et on le transfère dans un puits en plastique. On rince deux fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X), puis on  
25 fixe les cellules avec du méthanol froid 100 %, pendant 10 min à 4°C. On rince deux fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X), et on précipite avec du TCA froid 5 % pendant 20 minute à 4°C. On élimine le surnageant, et on rince quatre fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X).

On incube dans NaOH 0,3 N pendant 2 heures à température ambiante  
30 (dissolution de la couche cellulaire), sans dépasser 300 à 500 µL de NaOH. On récupère la solution dans un tube à scintillation auquel on rajoute 5 ml de liquide scintillant, et on détermine la radioactivité de la solution et du matériau à l'aide d'un compteur β (radioactivité négligeable).



A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

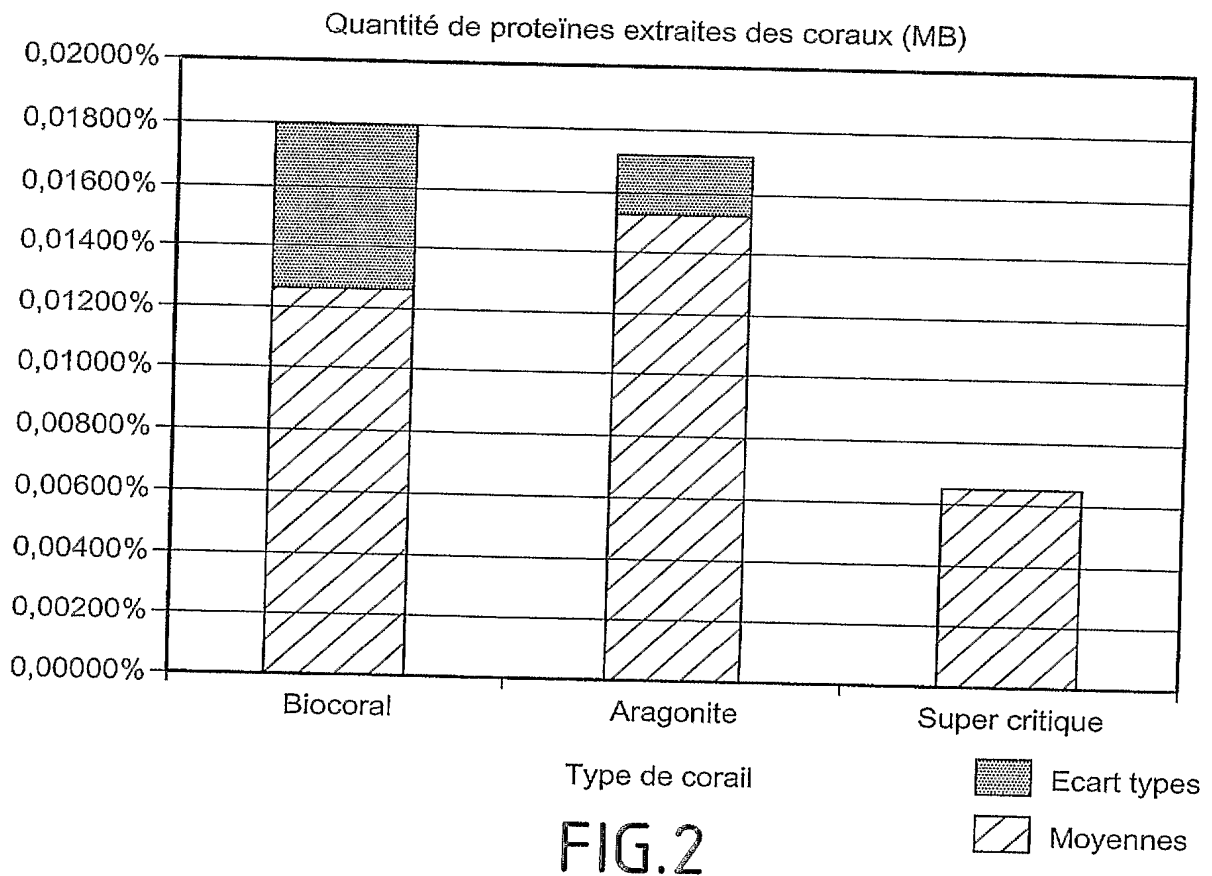
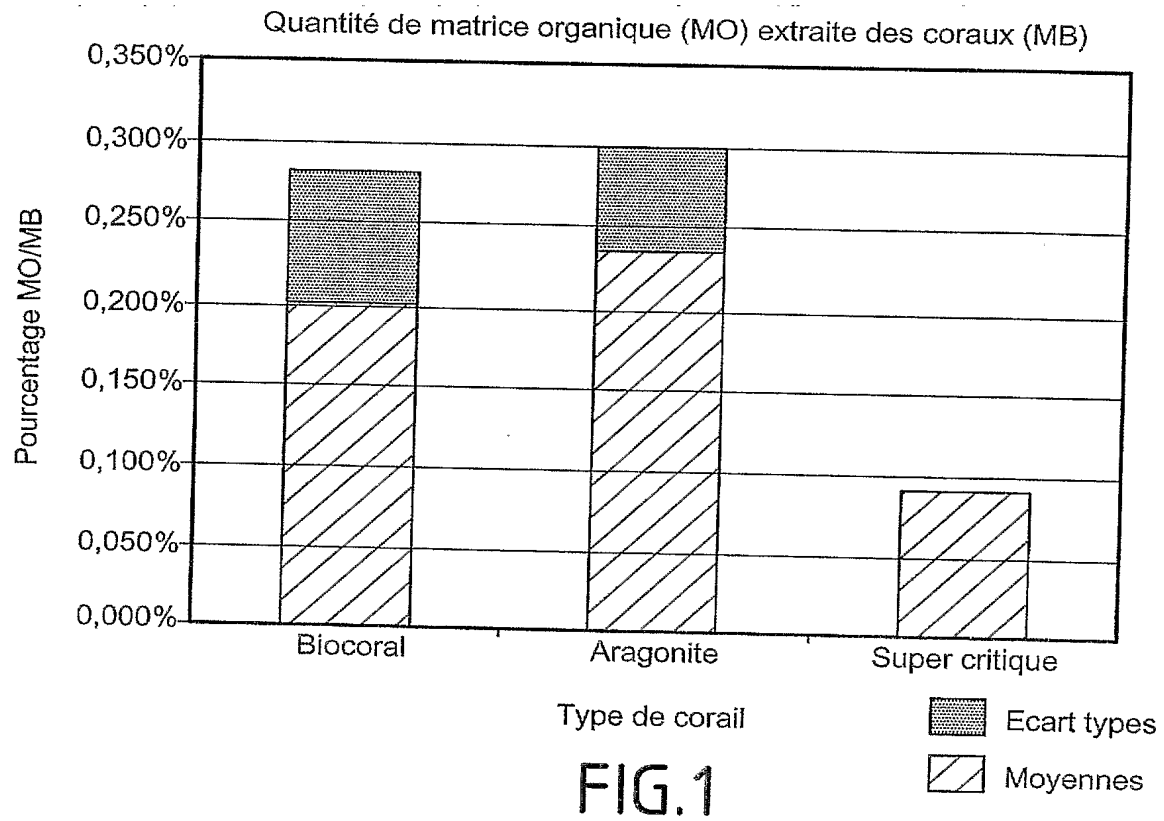
Les résultats sont présentés sur la Figure 3. On peut constater que la prolifération cellulaire des cellules MG63 sur le corail traité selon l'invention, est  
5 identique à celle observée sur le produit BIOCORAL®.

L'ensemble de ces résultats suggère que le corail traité selon la présente invention peut être utilisé dans la fabrication de substituts osseux.

**REVENDECATIONS**

1. Procédé d'extraction de substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide à une température inférieure à 270° C, de  
5 préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit fluide est choisi parmi l'éthanol, l'acétone, le dioxyde de carbone ou un mélange de fluide dont la  
10 température critique est inférieure à 270° C, de préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ledit fluide est l'éthanol.
- 15 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le corail est traité à une pression comprise entre environ 100 à 300 MPa, de préférence entre 120 et 250 MPa.
5. Corail obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 4.
- 20 6. Substitut osseux fabriqué à partir du corail selon la revendication 5.

1/2



2/2

Profilération des cellules MG63 sur les coraux ayant subi différents traitements

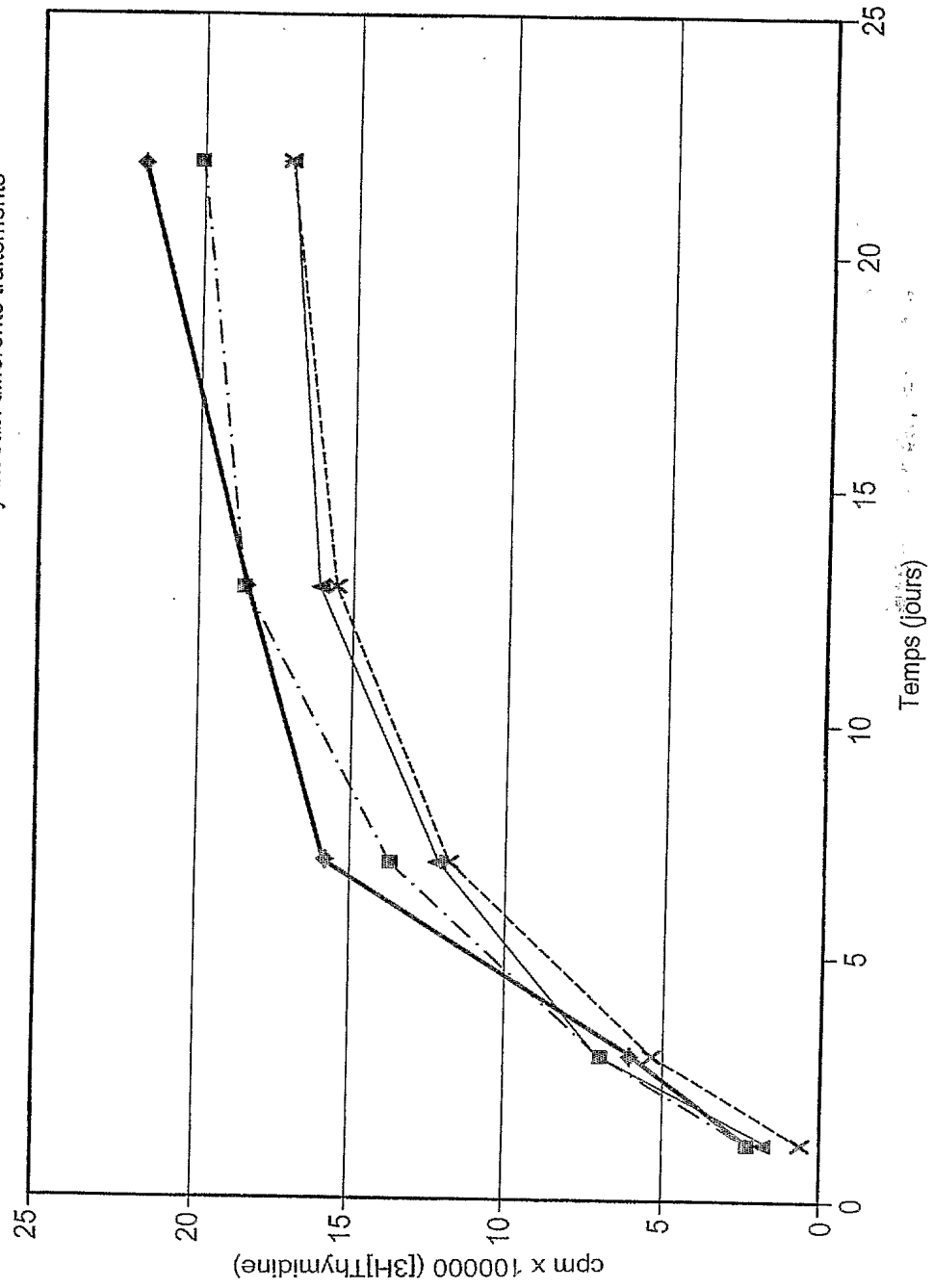
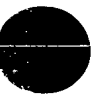


FIG.3



**PCT/FR2004/003126**

